

## 《総説》

## ゲノム編集の原理と利用、そして課題

間崎 剛<sup>1)</sup>

## 1. はじめに

本年（2018年）の11月26日、中国のある研究者が特定の遺伝子の機能をゲノム編集により破壊した受精卵から女兒を誕生させたという報道が、世界を駆け巡った。ゲノム編集は近年注目を浴びている新しい遺伝子改変技術であり、難病の治療手段としても期待されている。この女兒の場合は、ヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus: HIV）への耐性付与を目的として、HIV がヘルパー T 細胞に侵入する際に足がかりとなるケモカイン受容体（CCR5）遺伝子を破壊したとのことである。

この臨床研究の問題点は2点あると、筆者は考える。1点は、患者本人の同意のもとで行われる遺伝子治療とは異なり、当然であるがその女兒にはCCR5を欠損することによるリスクに関して説明を受ける機会と、その上で遺伝子改変を受け入れるかどうかを選択する機会とが与えられなかった点である。また、体細胞に施す1世代限りの遺伝子改変とは異なり、受精卵に施した改変はそれから発生した個体の生殖細胞にも伝わることから、CCR5の欠損は女兒の子孫にも伝播する可能性が高い。つまりこの行為は、誕生した女兒、およびその子孫に対する重大な人権侵害であると言える。

もう1つの問題点は、ゲノム編集という手法により特定のDNA配列を人為的に書き換えたヒト個体を発生させたという点である。ゲノム編集はDNA配列を1塩基レベルで書き換えることができる遺伝子改変技術であることから、肌や髪、目の色などの身体的特徴、さらには才能や能力などを自由に改変した人間（デザイナー・ベビー）を生み出すことも、原理としては可能とする技術である。そのため各国で

は、ヒトの生殖細胞や配偶子、接合体、胚の遺伝子改変は固く禁じられており、それは中国においても同様である。先の報道が事実であるならば、その研究者は自国の指針にも反したことになる。

現時点（2018年12月末）では、その実験データや女兒の存在は確認されず、また、女兒が出産されたという病院も事実関係を否定している。筆者は今、中国のその研究者が発表したことが事実であるかどうかに関わらず、ゲノム編集とはどのような原理に基づく遺伝子改変技術なのか、そして、我々の生活をどのように豊かにする技術なのか、一方でその実施によりどのような悪影響が生じる恐れがあるのかについて、一人でも多くの人に知ってもらう必要があると感じている。そこで僭越ながら、本総説を試みることにした。

## 2. ゲノム編集の概要

今から10年ほど前に登場した“ゲノム編集（genome editing）”は、旧来の遺伝子組換え技術とは原理の異なる、新しい遺伝子改変技術である。ゲノム編集により、旧来の手法では困難であった計画的なDNA配列の書き換えや、非モデル生物の遺伝子改変が容易になった。さらにゲノム編集では、旧来の手法に比べてはるかに簡便に、そして短時間のうちに遺伝子改変生物（genetically modified organism: GMO）が作製できる。今後の人類の目標である“持続可能社会の形成”を達成するために我々は、食料問題やエネルギー問題、環境問題などの諸問題を解決していかなければならない。望ましい形質を付与したGM生物の利活用は、それら諸問題の解決に有効な手段であるとみなされている。以上

1) 名古屋学芸大学管理栄養学部管理栄養学科

のことからゲノム編集は、今世紀の人類の発展を支える基盤技術となるものと予測される。

ゲノム編集は、染色体の任意の部位において DNA 二本鎖切断 (double strand break) を誘発する技術である。その損傷は、細胞に備わる 2 種類の修復機構 (非相同末端結合、相同組換え修復) のいずれかにより速やかに修復される。非相同末端結合による修復では、切断部位に DNA 塩基の挿入や欠失が生じることが多いため、これにより遺伝子機能を破壊することができる (ノックアウト)。相同組換え修復の場合は、切断部位周辺を任意の DNA 配列に置き換えたり、外来の DNA 断片を挿入したりする (ノックイン) ことが可能となる。これにより、翻訳産物のアミノ酸残基の置換や翻訳産物のタグ付け、遺伝子多型の改変、外来遺伝子の導入などが実施できる。それらの実施方法について、原理の説明をまじえつつ以下に概説する。

### 3. 染色体の任意の部位を切断する、3つの方法

染色体の特定の部位における DNA 二本鎖切断は、特定の DNA 配列を認識して結合するように改変した人工 DNA 結合ドメインと DNA 切断ドメインとの融合タンパク質 (ZFN, TALEN) により実施する。あるいは、古細菌や細菌の持つ獲得免疫機構 (CRISPR) を応用した方法により実施する。以下に、これらの方法を概説する<sup>1)</sup>。

#### 3.1 ZFN (zinc-finger nuclease)

RNA ポリメラーゼ III による転写に関与する転写因子 TFIIIA 中のジンクフィンガードメインを活用する方法である<sup>2)</sup>。その Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> 型ジンクフィンガードメインは、3つの DNA 塩基を認識して結合する。そのドメイン中のアミノ酸残基を置換して数個のドメインを連結することにより、染色体の特定の部位に結合する DNA 結合ドメインに仕立て上げる。それを、II 型制限酵素 *FokI* の配列非依存的ヌクレアーゼドメインと融合させる (ZFN)。同時に、標的部位の下流側で反対鎖に結合する ZFN も作製する。これら 2つの ZFN が両 DNA 鎖に結合した結果、*FokI* が標的部位にて二量体を形成して、

二本鎖 DNA を切断する。ZFN はゲノム編集技術の黎明期に利用されていた方法であるが、その作製に手間がかかるため、現在ではあまり利用されていない。

#### 3.2 TALEN (transcription activator-like effector nuclease)

ジンクフィンガードメインの代わりに、植物病原体 *Xanthomonas* から分泌される TALE (transcription activator-like effector) タンパク質の DNA 結合ドメインを利用する方法である<sup>3)4)</sup>。その 34 アミノ酸からなる DNA 結合ドメインの 12 番目と 13 番目のアミノ酸残基を置換するだけで 4つの DNA 塩基のいずれかを認識するドメインが作製できるため、ZFN よりも作製が容易である。4~10個のドメインを作製して連結し、それを *FokI* のヌクレアーゼドメインと融合させる (TALEN)。ZFN の場合と同様に、反対鎖に結合する TALEN も作製して、標的部位を挟むように作用させる。後述する CRISPR/Cas 9 に比べて認識配列の特異性が高く、意図しない部位の切断活性 (オフターゲット活性) を低く保つことができる方法である。

#### 3.3 CRISPR/Cas 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)

古細菌や細菌に広く保存されている、ファージや外来プラスミドに対する獲得防御機構 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) を応用した方法である<sup>5)</sup>。この方法では、標的部位近傍の DNA と相補的塩基対を形成するガイド RNA (gRNA) が Cas (CRISPR-associated protein) ヌクレアーゼを標的部位に誘導して、その部位の二本鎖 DNA が切断される。一般的なゲノム編集では、*Streptococcus pyogenes* 由来の Cas 9 ヌクレアーゼが利用される。

20 bp ほどの gRNA を作製するだけで様々な生物種のあらゆる領域を対象にできるため、非常に簡便な方法である。また、複数の gRNA を同時に細胞に導入することで、多数の遺伝子座の同時破壊や染色体の大幅な欠失を狙うことも可能である。以上のことから現在では、CRISPR/Cas 9 がゲノム編集の主流を占めている。

しかし、gRNA はミスマッチを許容して標的以外の DNA 配列にも結合してしまうことから、CRISPR/Cas 9 は標的以外の部位をも切断してしまうオフターゲット作用の高い方法でもある<sup>6)</sup>。それを防ぐために、一本鎖切断型(ニッカーゼ型)に改変した Cas 9 と、標的部位近傍の両 DNA 鎖をそれぞれ認識する 2 種の gRNA を用いる方法が開発された。その方法では 2 種の gRNA が近接して結合した場合にのみ DNA 二本鎖切断が生じるため、オリジナルの CRISPR/Cas 9 法に比べて配列特異性が高く、オフターゲット活性も低い<sup>7) 8)</sup>。

### 3.4 ZFN や TALEN、gRNA/Cas 9 の細胞への導入方法

ZFN や TALEN、あるいは gRNA と Cas 9 の細胞への導入は、それらをコードする DNA を発現ベクター上に構築して、そのトランスフェクションにより実施する。対象の細胞へのトランスフェクションは、ウイルスやリポソームを介して、あるいはマイクロインジェクションやエレクトロポレーション、パーティクルガンにより行う。対象となる細胞に制限はなく、幹細胞や受精卵、培養細胞などあらゆる細胞に導入可能である。ただし植物の場合は、アグロバクテリウムを介して植物カルスに導入する方法が一般的である。ZFN や TALEN、gRNA をどの発現ベクター上に構築するか、またはそれらをどのトランスフェクション法にて細胞に導入するかは、導入する DNA のサイズや導入効率に応じて選択すればよい。

トランスフェクション効率が低い場合は、ZFN や TALEN、あるいは gRNA と Cas 9 をコードする DNA を転写して RNA とし、それをリポソームに封入して細胞に導入することも試みられる。または、ZFN や TALEN をタンパク質として、gRNA/Cas 9 を RNA・タンパク質複合体にして、それらをエレクトロポレーションにより細胞に導入することもある<sup>9)</sup>。これらの方法は転写や翻訳の手間を要するものの、RNA やタンパク質は細胞内でのターンオーバーが速いことから、DNA として導入する場合に比べてオフターゲット活性が低いという利点もある。

### 3.5 ZFN や TALEN、CRISPR/Cas 9 の、ゲノム編集以外への利用

ジンクフィンガーや TALE といった DNA 結合ドメインを転写アクチベーター (VP16 など) や転写リプレッサー (KRAB など) と融合したものは、人工転写調節因子として利用できる。また、ヒストン修飾酵素やシトシンメチル化酵素と融合すれば、特定の領域のエピゲノムを調節することも可能である。GFP 融合体は生細胞における遺伝子座の可視化を (ライブイメージング)、エピトープタグ融合体は特定の領域のクロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation: ChIP) を可能とする。これらのことを CRISPR/Cas 9 のシステムで実施したい場合は、ヌクレアーゼ活性を欠失させた dCas 9 を上記の種々の機能ドメインと融合させればよい<sup>10)</sup>。

## 4. DNA 二本鎖切断の修復

ZFN や TALEN、あるいは CRISPR/Cas 9 により誘発された DNA 二本鎖切断は、以下に概説する 2 種類の機構 (NHEJ、HDR) のいずれかにより修復される。その際に DNA 塩基の挿入や欠失 (NHEJ)、あるいは任意の DNA 断片への置換や挿入が生じる (HDR)。

### 4.1 非相同末端結合 (nonhomologous end joining: NHEJ)

切断末端同士が、そのままつなぎ合わされる修復である。ZFN や TALEN、あるいは gRNA と Cas 9 を導入した細胞では標的部位の切断が繰り返し発生するために修復のエラーが高頻度で発生し、塩基の挿入あるいは欠失が生じる。これにより、任意の遺伝子の機能を破壊できる (ノックアウト)。

### 4.2 相同組換え修復 (homology directed repair: HDR)

姉妹染色体のいずれかに DNA 二本鎖切断が生じた場合に、切断されていない染色体の相同領域を鋳型にして修復される機構のことである。これを逆手に取れば、染色体上の特定の部位の DNA 配列の置換や、特定の部位への外来 DNA の挿入 (ノックイン) が可能となる<sup>11)</sup>。



そのために、置換もしくは挿入したい DNA 断片を対象染色体の標的部位の前後配列で挟んだ DNA 断片（ドナー DNA）を用意する。そのドナー DNA を DNA 二本鎖切断の場に共存させると、ドナー DNA を鋳型にした HDR が行われる。その結果、ドナー DNA の中央部が切断部位に挿入されることとなる。

多くの生物では HDR よりも NHEJ が優先的に作用し、ドナー DNA を共導入しても期待通りに置換・挿入されないことが多い。NHEJ を抑制したり HDR を促進したりする効果のある薬剤がいくつか発見されたことにより、近年では、HDR の効率が改善されつつある<sup>12)13)</sup>。

## 5. ゲノム編集の利点と利用

旧来の遺伝子組換え技術では、外来遺伝子の挿入部位を制御することは難しかった。そのため、導入した外来遺伝子が期待通りの発現を示さないことや、宿主の内在遺伝子を破壊してしまい予想外の変化をもたらすことが多々あった。そのような偶然性を排除できない旧来の遺伝子組換え技術とは異なり、ゲノム編集は遺伝子改変を施す部位を自由に選択できるため、極めて計画的な手法である。

遺伝子改変を施す部位を自由に選択できるということは何にもまして、遺伝子破壊株（ノックアウト株）の作成において威力を発揮する。これまでは、ノックアウト株の作製が困難であるという理由から、遺伝子機能を破壊したい場合は RNAi (RNA interference) によるノックダウンの手法が頻用されてきた。しかし RNAi では、対象の遺伝子の発現が完全に消失するわけではない。したがって RNAi 株には、対象の遺伝子の機能が残存している懸念が常に生じていた。一方ゲノム編集は、タンパク質コード領域に DNA 塩基の挿入か欠失を導入してフレームシフトを誘発することにより、その遺伝子機能を完全に喪失させられる手法である。

また、旧来の遺伝子組換え手法を利用してノックアウト株を作製する場合は、相同組換え活性の高い胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) を利用する必要があった。したがっ

て、ES 細胞株が樹立できない生物種や植物においては、特定の遺伝子を標的としてノックアウト株を作製することは不可能であった。DNA 二本鎖切断修復機構はすべての細胞生物に普遍的な機構であることから、ゲノム編集はすべての生物に適用できる技術である。つまりゲノム編集は、あらゆる生物・細胞において計画的なノックアウト株の作製を可能にする技術であり、GM 生物の作製や遺伝子治療を支える技術である。

ゲノム編集にて導入される 1 塩基レベルの挿入や欠失、置換は、自然界において日常的に発生している点突然変異と同等の変化である。したがって、大幅な欠失や異種生物の DNA 領域の挿入をとみなさないゲノム編集により作製した GM 生物は、従来の品種改良法により作製した新品種と同等であるとみなすこともできる。そのためアメリカやアルゼンチンなどの国では、ゲノム編集により作製した GM 作物の利用に関して特に規制は設けられていない。

ゲノム編集に要する操作は、基本的には溶液を加えたり、混合したりするだけである。そのためゲノム編集は、(マイクロインジェクションを除き) 初心者でも容易に実施できる手法である。また、特殊な装置や設備は必要とせず、一般的な実験室であればすでに備わっているような機器を用いて実施できる。ステップも少なく、偶然性の低い遺伝子改変手法であることから、要する時間も旧来の方法に比べてはるかに短い。

以上のことから、ゲノム編集はこれまでの遺伝子組換え手法に代わる新しい手法であり、特殊な事情のない限り今後の遺伝子改変はすべてゲノム編集で行われるものと思われる。ゲノム編集がどのようなことの解明に有効な手段であり、また、どのようなことに利用できる技術であるのかを、以下に概説する。

### 5.1 遺伝子機能の解明

興味のある遺伝子があれば、そのノックアウト株や GFP 融合体、またはアミノ酸置換体を作製する。その遺伝子改変株の表現型を観察することにより、その遺伝子の機能や局在、ドメインの機能が推察できる。また、それらの遺伝子

改変株を用いたオミクス解析は、相互作用因子やシグナル伝達経路の解明に貢献する。

数万の gRNA ライブラリーを用いて、多数の遺伝子をランダムにノックアウトすることもできる。その細胞集団の中から興味深い表現型を示す細胞を単離して次世代シーケンサーによるリシーケンスを実施することにより、ノックアウトされた遺伝子が同定できる。これにより、特定の生理機能の発揮に重要な役割を担っている遺伝子が明らかにできる。

## 5.2 有用な形質を備えた GM 生物の作製

内在の遺伝子を改変することにより、あるいは他の生物種の遺伝子を導入することにより、病冷害に強い農作物、肉量の多い家畜、成長の早い養殖魚など、食糧の増産に貢献する GM 生物が作製できる。また、アレルゲンを低下させた卵、花粉症を緩和するコメ、認知症の予防に効果的な野菜など、消費者にメリットのある GM 生物の作製も可能である。

ゲノム編集は、水素生産菌、バイオ燃料となる油脂を蓄積する藻類、生分解性プラスチックの原材料を生産する乳酸菌など、環境問題の解決に貢献する生物の生産性向上にも利用できる技術である。また、重金属や放射性元素により汚染された土壌の浄化に貢献する微生物や植物の作製も可能である（バイオレメディエーション、ファイトレメディエーション）。

ある遺伝子改変を誘発するようなゲノム編集因子自体を発現させた GM 生物が野生個体と交配した場合、野生個体に由来する染色体も積極的に遺伝子改変を受ける。これにより、遺伝子変異を特定の生物種内に急速に伝播させる手法のことを“遺伝子ドライブ”という。この手法に基づき、生存や繁殖に不利な遺伝子改変を誘発する個体を環境中に放散することにより、その生物種の撲滅が可能となる。これは、農作物に害をおよぼす病害虫の防除、マラリアやデング熱を媒介する蚊の根絶、生態系に悪影響をおよぼす外来種の駆逐に威力を発揮する手法である。

## 5.3 疾患の治療、薬効や副作用の確認

患者から採取した細胞にゲノム編集を施し、培養した後に患者の体内に戻す（遺伝子治療）。

病因遺伝子の不活化を目的とする場合は NHEJ を、病的変異の置換修復が目的ならば HDR を誘導する。遺伝性疾患の治療だけでなく、HIV ウイルスの増殖抑制や、がん免疫療法の賦活化にも効果を発揮する。

また、ゲノム編集技術を利用すれば、ヒトの遺伝子異常を再現した実験動物が数ヶ月のうちに作製できる。一般的な遺伝性疾患のモデル動物は、その疾患の新薬開発に威力を発揮する。また、個々の患者の遺伝子異常を再現した疾患モデル動物は、患者に治療を施す前の治療効果の検証や、薬の効果や副作用の確認に役立つ。以上のことからゲノム編集は、個別化医療の発展にも欠かせない技術である。

## 6. ゲノム編集の課題

### 6.1 オフターゲットのリスク

現時点のゲノム編集では、意図せぬ部位をも切断してしまうオフターゲットの発生を完全に排除することは難しい。それにより、新たなアレルゲンの発生や、細胞のがん化が誘発されることがありえる。実験動物や GM 作物の場合ならば、野生種との交配により標的部位以外の変異を減らすことが可能である。しかし遺伝子治療の場合は、ゲノム編集によるがん化のリスクについてあらかじめ患者に伝えてインフォームド・コンセントを得る必要がある。また、ゲノム編集を施した細胞を患者の体内に戻す前に、次世代シーケンサーによるリシーケンスを実施して標的部位以外の変異の有無を確認する必要もある。

### 6.2 GM 生物の作製に用いる際の課題

GM 生物は人類が抱える様々な諸問題を解決する有効な手段である一方で、その拡散が野生種の生存や繁殖に悪影響をおよぼすこともありえる。そのため、GM 生物の使用等に関しては国際的な枠組みが定められ（カルタヘナ議定書）、我が国では“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（通称“カルタヘナ法”）により規制されている。ゲノム編集は 1 塩基レベルの遺伝子改変を可能とする技術のため、ある個体の変異が突

然変異により自然に発生したものなのか、それともゲノム編集により人為的に導入された変異なのか、その区別は困難である。以上のことからゲノム編集は、GM生物の使用等の規制をいくぐるために悪用されかねない技術である。

ゲノム編集技術に基づく遺伝子ドライブを実施して病虫害の撲滅を試みた結果、副次的な効果により生物多様性に重大な危機が生じることもありえる。ある生物種内における遺伝子変異の拡散は不可逆的なものであることから、遺伝子ドライブの実施に先立っては入念な影響評価が欠かせない。

### 6.3 受精卵を用いた研究に用いる際の課題

ゲノム編集は、ヒトの受精卵等の生殖細胞に適用することでデザイナー・ベビーの作製を可能にしてしまう技術である。そのため、遺伝子改変を施した受精卵の着床は、国際学会において自主的に規制されている。我が国の場合は、厚生労働省の定める“遺伝子治療等臨床研究に関する指針”において、着床の有無にかかわらずヒトの受精卵の遺伝子改変が禁止されている。しかし一方で、ゲノム編集はヒトの受精や発生のメカニズムの解明において威力を発揮する手法であり、それによる生殖補助医療分野の発展が期待されている。そのため我が国では、一部の基礎研究に限りゲノム編集による受精卵の遺伝子改変が解禁される見通しである。しかし、遺伝子改変を施した受精卵をヒトや動物の子宮に移植することは許可されない。

## 7. 最後に

ゲノム編集は、ゲノムという生物の根幹をなす物質を不可逆的に修飾する技術であることから、その使用が人類および地球環境に取り返しのつかない悪影響をおよぼしてしまう可能性が考えられる。しかし、難病や不妊に苦しむ人々にとっては光明となる新技術であることも事実である。また、今後の人類の食糧やエネルギーの安定供給を考えた場合、この技術の使用を禁止することの方がより大きい不利益を招くと考えられる。緊急性の有無、また、ゲノム編集を実施することで得られる利益とそれにより発生

するリスクとを秤にかけ、ケースごとに選択することが肝心であると考ええる。

人はつい、理解できないものに対して“危険なもの”というレッテルを貼ってしまう。本総説によりゲノム編集に対する理解が少しでもひろがり、理由もなく危険な技術というわけではないことが一人でも多くの読者に伝われば良いと思う。

## 8. 参考文献

- 1) Gaj, T., Gersbach, C.A., Barbas C.F.III, “ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering.” *Trends Biotechnol.* (2013) 31: 397-405.
- 2) Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.L., *et al.* “Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases.” *Nature* (2005) 435: 646-651.
- 3) Mahfouz, M.M., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., *et al.* “De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2011) 108: 2623-2628.
- 4) Bogdanove A.J., Voytas, D.F. “TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting.” *Science* (2011) 333: 1843-1846.
- 5) Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., *et al.* “A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.” *Science* (2012) 337: 816-821.
- 6) Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., *et al.* “High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells.” *Nat. Biotechnol.* (2013) 31: 822-826.
- 7) Mali, P., Aach, J., Stranges, P.B. *et al.* “CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering.” *Nat. Biotechnol.* (2013) 31, 833-838.
- 8) Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., *et al.* “Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity.” *Cell* (2013) 154: 1380-1389.
- 9) Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., *et al.* “Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system.” *Nat.*

*Protoc.* (2013) 8: 2281-2308.

- 10) Chen, B., Gilbert, L.A. Cimini, B.A., *et al.* "Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system." *Cell* (2013) 155: 1479-1491.
- 11) Beumer, K.J., Trautman, J.K., Mukherjee, K., *et al.* "Donor DNA utilization during gene targeting with zinc-finger nucleases." *Genes Genomes Genetics* (2013) 3: 657-664.
- 12) Yu, C., Liu, Y., Ma, T., *et al.* "Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells." *Cell stem cell* (2015) 16: 142-147.
- 13) Chu, V.T., Weber, T., Wefers, B., *et al.* "Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells." *Nat. Biotechnol.* (2015) 33: 543-548.